

Isolation, Induction of Neural and Glial Differentiation and Evaluating the Expression of Five Self Renewal Genes in Adult Mouse Neural Stem Cells

***Fathi F., Ph.D. *, Jafari Kermani A.M.Sc, Golbar M.R.M.Sc, Izadpanah E. M.Sc.,
Golmohammadi M.Gh., Ph.D., Mowla S.J., Ph.D., Asgari A., Ph.D.***

** Cellular and Molecular Research Laboratory, KDRC, Kordestan Medical Sciences University, Sanandaj, Iran*

Abstract

Purpose: Isolation, induction of neural and glial differentiation and evaluating the expression of Nucleostemin, ZFX, Hoxb-4, Sox-9 & Bmi-1 self renewal genes in adult mouse neural stem cells

Materials and Methods: Briefly, for isolation of neural stem cells, frontal part of adult mouse brain was minced in PBS and digested by enzyme solution, containing hyaluronidase and trypsin. Isolated cells were cultured in medium supplemented by EGF, bFGF. After one week, primary neurospheres were appeared in culture medium which differentiated into neural and neuroglial cells, after transferring to poly-L-ornyethin coated dishes. Differentiated cells were examined by morphological, immunocytochemical and molecular evaluations.

Results: Our results showed that isolated cells from periventricular area of mouse adult brain can be expanded in medium containing EGF, bFGF and Fetal calf serum and differentiated into neural and neuroglial cells. Immunocytochemical studies for GFAP, MAP2 and O4 genes, proved the differentiation. Our results also showed that Nucleostemin, ZFX, Hoxb-4, Sox-9 & Bmi-1 are expressed in mouse neural stem cells.

Conclusion: Mouse adult brain contains a type of stem cell which can be differentiated into neural and neuroglial cells. In addition, expression of Sox-9, Nucleostemin and Bmi-1 self renewal genes in undifferentiated neural stem cells can be considered as a proof for stem cell identity of isolated cells. This study is the first report which shows the expression of ZFX and Hoxb-4 genes in neural stem cells.

Key words: Neural stem cells , Self renewal, Neural cells , Neuroglial cells

جداسازی، القای تمایز عصبی و گلیال و بررسی بیان پنج ژن خود بازسازی در سلولهای بنیادی عصبی مغز موشهای بالغ

✉ فردین فتحی Ph.D.*، عباس جعفری کرمانی M.Sc.**، محمد رضا گلبار M.Sc.**، اسماعیل ایزد پناه M.Sc.***

محمد قاسم گل محمدی Ph.D.***، سید جواد مولا Ph.D.**، علیرضا عسکری Ph.D.***

* آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی مولکولی، KDRC، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان

** گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس

*** گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه

*** گروه علوم پایه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

تاریخ وصول: اسفندماه ۸۵، تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۸۶

چکیده

هدف: جداسازی، القاء تمایز عصبی و گلیال و بررسی بیان ژنهای خود بازسازی Nucleostemin، Bmi-1، ZFX، Hoxb-4 و Sox-9 در سلولهای بنیادی عصبی مغز موشهای بالغ

مواد و روشها: تحقیق حاضر یک مطالعه تجربی است. به طور خلاصه، برای جدا سازی سلولهای بنیادی عصبی از مغز موش، بخشی از ناحیه دور بطنی مغز موشهای بالغ جداسازی و قطعه قطعه شد. سپس از محلولهای آنزیمی حاوی هیالورونیداز و تریپسین برای هضم بافتی و خارج ساختن سلولهای بنیادی عصبی استفاده شد و سلولهای به دست آمده در محیط حاوی فاکتورهای رشد EGF و bFGF کشت داده شدند. پس از یک هفته نوروسفرهای اولیه به صورت معلق در محیط کشت ظاهر شدند که پس از انتقال به دیشهای آغشته به پلی -ال-ارنیتین، به سلولهای نوروگلیال و عصبی تمایز پیدا کردند. سلولهای تمایز نیافته و تمایز یافته تحت ارزیابیهای مورفولوژیک، ایمونوسیتوشیمی و مولکولی قرار گرفتند.

یافته ها: نتایج مشاهدات مختلف به عمل آمده در این پژوهش نشان داد که سلولهای جدا سازی شده از ناحیه دور بطنی شاخ قدامی مغز موشهای بالغ در محیط کشت حاوی فاکتورهای رشد EGF (Epidermal Growth Factor) و bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) تکثیر شده و در دیشهای آغشته به پلی -ال-ارنیتین و محیط کشت حاوی یک درصد سرم جنین گاوی به سلولهای عصبی و گلیال تمایز پیدا می کنند. بررسیهای ایمونوسیتوشیمی برای ژن های GFAP، MAP2 و O4 صحت انجام این تمایز را نشان داد. همچنین بیان ژنهای Nucleostemin، Bmi-1، ZFX، Hoxb-4 و Sox-9 در سلولهای بنیادی عصبی نشان داده شد.

نتیجه گیری: از این پژوهش می توان نتیجه گرفت که مغز موشهای بالغ حاوی رده ای از سلولهای بنیادی است که این سلولها قادرند به سلولهای عصبی و گلیال تمایز پیدا کنند و بیان ژنهای Nucleostemin، Bmi-1 و Sox-9 در سلولهای جداسازی شده، تاییدی بر ماهیت بنیادی این سلولها بود. همچنین مطالعه حاضر اولین گزارش مبنی بر بیان ژنهای مسئول خود بازسازی ZFX و Hoxb-4 در سلولهای بنیادی عصبی است..

کلید واژه ها: سلولهای بنیادی عصبی، خود بازسازی، سلولهای عصبی، سلولهای نوروگلیال

✉ آدرس مکاتبه: سنج، انتهای خیابان پاسداران، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، دانشکده

پزشکی، KDRC، آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی مولکولی

E-mail: farfath@yahoo.com

مقدمه

طی یکی دو دهه اخیر سلولهای بنیادی مورد توجه زیادی قرار گرفته اند. این سلولها به عنوان یک عامل درمانی بالقوه برای بیماریهای تحلیل رونده و ارگانهای آسیب دیده از ویژگیهای منحصر به فردی برخوردارند [۱]. در حیوانات بالغ، سلولهای بنیادی در ارگانهای مختلفی از بدن از جمله مغز، مغز استخوان، ماهیچه اسکلتی، روده، اپی درم، کبد و غیره وجود دارند که این سلولها احتمالاً به شکل فیزیولوژیک یا پاتولوژیک، سلولهایی را جایگزین می کنند که در نتیجه آسیب بافتی یا ابتلا به بیماریهای تخریبی خاص از بین رفته اند [۶-۲]. مغز پستانداران از دیر باز به عنوان یک ارگان با قدرت ترمیمی خیلی کم در نظر گرفته شده است. به طوری که رامون کاخال در اوایل قرن بیستم، سیستم عصبی مرکزی را بدین گونه توصیف

می کند: «هنگامی که رشد و تکامل سیستم عصبی به پایان رسید، چشمه های رشد و بازسازی به طور برگشت ناپذیری خشک می شوند». به عبارت دیگر از مدتها پیش تصور بر این بود که در سیستم عصبی مرکزی سلولهای بنیادی وجود ندارد [۱]. اما اخیراً شواهد زیادی ارایه شده که آن عقیده قدیمی را نقض کرده و بیانگر این هستند که در سیستم عصبی مرکزی هم سلولهایی وجود دارند که دو ویژگی منحصر به فرد سلولهای بنیادی یعنی توانایی خود بازسازی و تمایز به سلولهای مختلف سازنده بدن را دارا هستند [۷ و ۸]. در حال حاضر علاوه بر اینکه وجود سلولهای بنیادی عصبی (NSCs) [۱] در سیستم عصبی پستانداران بالغ به اثبات رسیده است، همچنین نشان داده شده است که عصب زایی در نواحی خاصی از مغز ادامه پیدا کرده و حتی بعضی از شرایط پاتولوژیک نظیر ایسکمی، فرایند عصب زایی را در مغز

پستانداران بالغ القا می کند [۹ و ۱۰]. سلولهای بنیادی عصبی به عنوان یک ابزار درمانی برای ترمیم بعضی از اختلالات CNS از پتانسیل زیادی برخوردار هستند. این سلولها را می توان از مغز جنین یا مغز یک موجود بالغ جدا سازی کرد یا اینکه آنها را از سلولهای بنیادی جنینی تولید کرد. سلولهای بنیادی عصبی در محیط آزمایشگاه قادر به تکثیر هستند، بدون اینکه طی مراحل تکثیر، خاصیت چند استعدادی خود را از دست دهند [۱۰]. همچنین علاوه بر حیواناتی نظیر موش سوری و موش صحرایی، سلولهای بنیادی عصبی از نواحی مختلفی از مغز جنین انسان، نوزاد و فرد بالغ نیز جدا سازی شده است. هیپوکامپ، ناحیه دور بطنی اطراف شاخ قدامی بطن طرفی و اخیراً کورتکس، آمیگدال و نخاع از جمله نواحی مغزی هستند که تاکنون از آنها سلولهای بنیادی عصبی جداسازی شده است. این یافته ها امکان پیوند اتولوگ سلولهای بنیادی عصبی را نوید می دهند [۱۱]. مطالعات دیگر نشان می دهد که سلولهای بنیادی عصبی انسانی، بازسازی اکسونهای کورتیکواسپینال را ارتقا بخشیده و با نورونهای میزبان بعد از پیوند سیناپس تشکیل می دهند [۱۲]. سلولهای بنیادی عصبی، فاکتورهای نوروتروفیک مفید (GDNF و NGF) برای نورونهای آسیب دیده را ترشح می کنند. این فاکتورها از سمیت سلولی القا شده توسط گلوتامات محافظت به عمل آورده و بقای نورونهای حرکتی آسیب دیده را ارتقا می بخشند [۱۳]. پیوند سلولهای بنیادی عصبی (NSCs) در دو دهه اخیر به عنوان یک روش درمانی انتخابی در آسیبهای مغزی، بیماریهای تحلیل رونده عصبی و اختلالات نورولوژیک خاص مطرح شده است. موفقیت در درمان برخی از بیماران پارکینسونی با استفاده از بافت مزانسفالیک جنینی انسان امید به استفاده از سلولهای بنیادی عصبی، برای درمان یا ترمیم

جراحی‌ها و آسیب‌های مغزی را در محققین ایجاد کرده است [۱۴ و ۱۵].

بنابراین نظر به اهمیتی که جدا سازی سلول‌های بنیادی عصبی در انجام مطالعات مربوط به تکوین سیستم عصبی، چگونگی تمایز سلول‌های عصبی و نیز به کار گیری این سلول‌ها در درمان دارد، در این پژوهش اقدام به جدا سازی و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی موش به سلول‌های عصبی و گلیال شده و بیان ژنهای اختصاصی در سلول‌های تمایز نیافته و سلول‌های حاصل از تمایز مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی بیان ژنهای مسئول خودبازسازی در سلول‌های مختلف دارای اهمیت بسیار زیادی است. چون در صورت مشخص شدن مکانیسم‌های دخیل در تنظیم پتانسیل خودبازسازی سلول‌های بنیادی، جهش بزرگی در روش‌های سلول درمانی به وقوع خواهد پیوست. چرا که سلول‌های بنیادی مورد استفاده در روش‌های درمانی، تا حد زیادی تحت کنترل واقع شده و در نتیجه، نه تنها از خطر ایجاد تراتوما توسط آنها کاسته می‌شود، بلکه تمایز آنها به سلول‌های مورد نظر نیز به صورت کاملاً "کنترل شده انجام خواهد گرفت. علاوه بر این از آنجا که وقوع سرطان در بافت‌های مختلف بدن حاصل از تکثیر کنترل نشده سلول‌ها است، در نتیجه شناسایی مکانیسم‌های خودبازسازی، کمک بزرگی برای توسعه روش‌های درمانی هدفمند خواهد بود. اولین قدم در راه شناسایی مکانیسم‌های خودبازسازی در یک نوع سلول بنیادی، مشخص کردن ژنهای خود بازسازی است که در آن نوع سلول خاص بیان می‌شوند. از طرفی نشان دادن بیان ژنهای مسئول خود بازسازی در سلول‌های جداسازی شده، تاییدی بر ماهیت بنیادی این سلول‌ها است. در این پژوهش علاوه بر بررسی بیان بعضی از ژنهای خود بازسازی شناخته شده مانند Nucleostemin، Bmi-1 و Sox-9، بیان دو ژن ZFX و Hoxb-4، که اخیراً نقش آنها در تنظیم خودبازسازی سلول‌های بنیادی جنینی و خونساز گزارش شده است، برای اولین بار در

سلول‌های بنیادی عصبی بررسی خواهد شد.

مواد و روشها

جداسازی سلول‌های بنیادی عصبی از مغز موش بالغ

ابتدا دیواره طرفی شاخ قدامی بطن‌های جانبی مغز موش‌های ۴ الی ۸ هفته ای نژاد C57 به بافر HBSS حاوی mg/ml ۰/۷ هیالورونیک اسید، mg/ml ۰/۲ کینورنیک اسید، ۱/۳۳ تریپسین و گلوکز ۲ میلی مولار منتقل شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰ g سانتریفیوژ شده و به HBSS حاوی سوکروز ۰/۹ مولار انتقال یافتند. پس از تهیه سوسپانسیونی از سلول‌ها، به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰ g سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد سلول‌ها در ۲ میلی لیتر محیط کشت حل شده و سپس به آرامی روی سطح ۱۰ میلی لیتر EBSS حاوی BSA منتقل شدند. سلول‌ها با دور ۲۰۰ g به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شده و یک بار با استفاده از محیط کشت DMEM/F12 شستشو داده شدند. در نهایت سلول‌ها در محیط کشت DMEM-F12 حاوی EGF 2ng/ml، 20ng/ml bFGF، 2، ۲ میلی مولار گلوتامین، ۱۰۰ U/ml پنی سیلین و ۱۰۰ μg/ml استرپتومایسین کشت داده شدند [۱۶]. پس از یک هفته در اثر تکثیر سلول‌های بنیادی، نئوروسفرهای اولیه در محیط کشت تشکیل شده که از طریق پاساژهای متوالی تا پاساژ دهم تکثیر شدند.

القای تمایز سلول‌های بنیادی عصبی به سلول‌های

عصبی و گلیال

به منظور القای تمایز سلول‌های بنیادی عصبی به سلول‌های عصبی و گلیال، حدود ۱۰ الی ۲۰ نئوروسفر تشکیل شده در پاساژ سوم به هر چاهک از دیش‌های کشت ۴ چاهکی پوشش

RNX [سیناژن] RNA کل را از سلولها استخراج نموده و پس از اطمینان یافتن از کیفیت RNA استخراج شده با انجام الکتروفورز ژل آگارز و اسپکترومتری، برای تهیه cDNA از پرایمر oligo(MWG-Biotech AG) dT و کیت RT (Bioneer) استفاده شد. واکنش RT در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت. پس از تهیه cDNA، واکنش PCR برای تکثیر قطعه مورد نظر انجام گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد و برای تهیه حجم مذکور علاوه بر DNA الگو (محصول واکنش RT) از کیت PCR (Bioneer)، آب مقطر استریل و پرایمرهای بالا دست ۱ و پایین دست ۲، با مشخصات مورد اشاره در جدول یک استفاده شد. پس از آماده ساختن حجم مورد نظر برای انجام واکنش، واکنش PCR با شرایط دناتوره شدن ۶۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، Annealing ۴۵ ثانیه در دمای ۶۰-۶۴ درجه سانتی گراد و Extention ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گرفت. تعداد ۳۵ سیکل و یک سیکل extention نهایی به مدت پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. برای انجام هر دو واکنش RT و PCR از دستگاه ماستر سایکلر (Eppendorf) استفاده شد. از آنجا که ژن GAPDH (3- Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) یک ژن House keeping است، به این معنا که این ژن همواره به یک میزان بیان می شود، این ژن به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

بعد از اتمام واکنش، ۸ میکرولیتر از محصول واکنش PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. توالی ژنهای مورد مطالعه از سایت NCBI گرفته شد و پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه با کمک نرم افزار Gene runner طراحی شدند.

داده شده با پلی-ال-ارنیتین (Sigma) منتقل شده و در محیط کشت حاوی یک درصد سرم جنین گاوی به مدت ۱۰ روز کشت داده شدند.

ارزیابیهای مورفولوژیک و ایمونوسیتوشیمی

در طول آزمایش از میکروسکوپ معکوس فلورسنت (Nikon TE 300-) برای ارزیابی سلولها استفاده شد. به منظور انجام ارزیابیهای ایمونوسیتوشیمی، سلولها در روز هفتم به مدت ۷ دقیقه در دمای اتاق با استفاده از متانول با دمای ۲۰- (Merck) یا پارافرمالدئید ۴ درصد تثبیت شدند. از بافر بلاک کننده حاوی Triton X-100 و سرم گونه ای که آنتی بادی ثانویه از آن تهیه شده بود، برای نفوذ پذیری سلولها و مهار آنتی ژنهای غیر اختصاصی که احتمال اتصال آنتی بادی ثانویه به آنها وجود داشت استفاده شد. آنتی بادیهای مونوکلونال اولیه

Nestin با غلظت $\frac{1}{100}$ ، Map2 با غلظت $\frac{1}{10}$ و آنتی بادی اولیه بر علیه GFAP با غلظت $\frac{1}{100}$ و O4 با غلظت $\frac{1}{100}$ به مدت ۲ ساعت مورد استفاده قرار گرفتند. از آنتی بادیهای ثانویه متصل به cy3 جهت اتصال به آنتی بادی های اولیه بر علیه Map2، O4 و Nestin با غلظت $\frac{1}{100}$ و آنتی بادی ثانویه متصل به FITC جهت اتصال به آنتی بادی بر علیه GFAP با غلظت $\frac{1}{100}$ به مدت یک ساعت در دمای اتاق استفاده شد. پس از شستشوی سلولها با بافر فسفات، از Vector hard set (Vector Laboratories) که همراه آن رنگ Dapi هم موجود بود، برای ماونت کردن سلولها استفاده شد و در نهایت سلولها به کمک میکروسکوپ فلورسانت مطالعه و عکسبرداری شدند.

ارزیابی RT-PCR

از RT-PCR برای تأیید بیان ژنهای مورد مطالعه (جدول ۱) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا با استفاده از محلول (Plus)

1- Forward
2- Reverse

جدول ۱. اسامی ژنها و توالی مربوط به پرایمرهای بالا دست (F) و پایین دستی (R) استفاده شده در این پژوهش

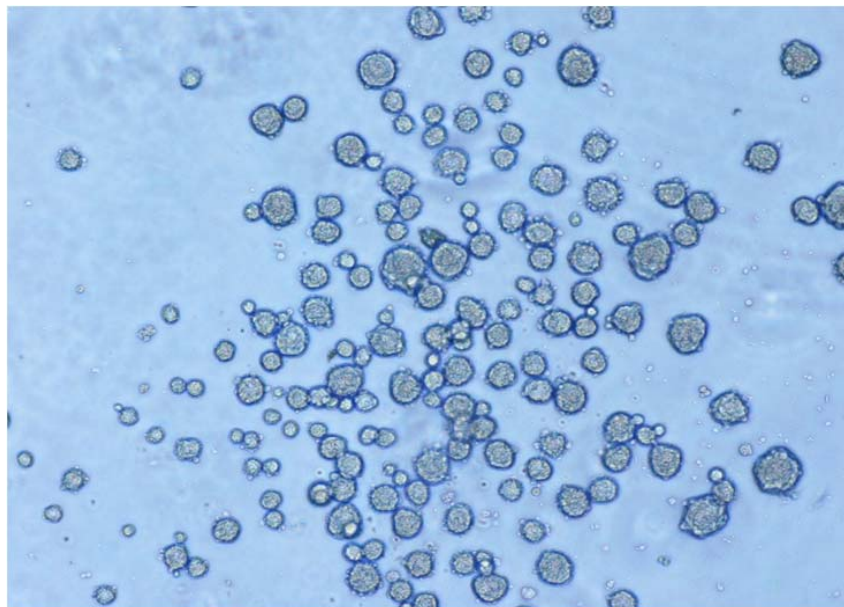
نام ژن	اندازه (bp)	توالی پرایمر
GAPDH	۳۰۸	F GCCCATCACCATCTTCCAG
		R TGAGCCCTTCCACAATGCC
BMI-1	۴۱۳	F TACTCCAGTGCAGTCTCCTC
		R TCCCATCTTTCCTAACACAG
Sox-9	۵۵۷	F CGCGTATGAATCTCCTGGAC
		R CGTTCTTCACCGACTTCCTC
ZFX	۵۴۸	F TCTGGACTGACTATGGACAACG
		R GTTTGGTACTGCCTGGAATCA
Nucleostemin	۷۴۷	F CAGAGATCCTCTTGTTGCAG
		R AATGAGGCACCTGTCCACTC
Hoxb4	۵۰۷	F CGTGCGAGGAGTATTACAG
		R GCGTCAGGTAGCGATTGTAGT

یافته‌ها

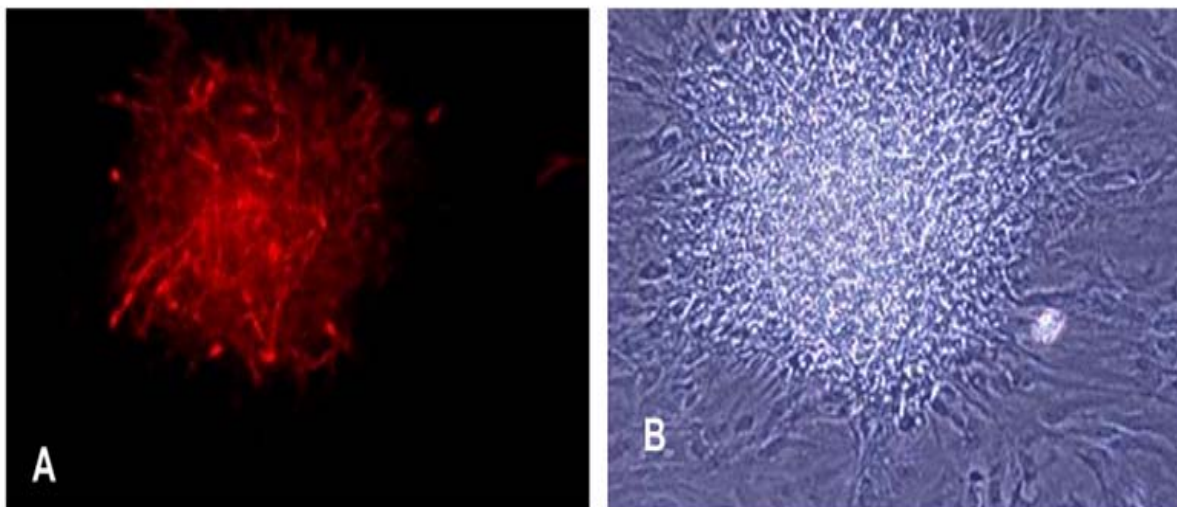
نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که سلولهای جداسازی شده با استفاده از روش مورد استفاده در این مطالعه، سلولهای بنیادی عصبی بوده و هنگام کشت در محیط فاقد سرم و حاوی فاکتور رشد EGF و bFGF به صورت معلق رشد کرده و پس از گذشت یک هفته، نوروسفرهای اولیه را تشکیل می دهند. طی پاساژهای متوالی این سلولها مجددا تکثیر شده و نوروسفرهای نسل سوم (شکل ۱) و... را تشکیل می دهند. در این مطالعه سلولهای جداسازی شده تا حدود ۱۰ پاساژ کشت داده شدند. نتایج ارزیابیهای ایمونوسیتوشیمی و PCR انجام شده ماهیت این سلولها را به عنوان سلولهای بنیادی عصبی تایید کرد (شکلهای ۲ و ۵). یک روز بعد از انتقال سلولهای بنیادی عصبی به دیشهای کشت آغشته به پلی -ال- ارنتین، به منظور القای تمایز عصبی و گلیال در آنها، سلولها شروع به چسبیدن به کف ظرف نموده و به تدریج به سلولهای عصبی و گلیال تمایز پیدا کردند و تا پایان آزمایش

بر تعداد و تراکم سلولهای مذکور افزوده شد. (شکل ۳). نتایج ارزیابیهای سلولی و مولکولی انجام شده ماهیت این سلولها را به عنوان سلولهای عصبی یا نورون، آستروسیت و الیگودندروسیت تایید کرد (شکل ۴). در مطالعات ایمونوسیتوشیمی، پاسخ به آنتی بادیهای اولیه و ثانویه مثبت بود و بسته به نوع آنتی بادی ثانویه با فیلترهای Texas-red و FITC قابل مشاهده بودند. در شکل ۲ سلولهایی که در مرکز نوروسفرها قرار دارند، سلول بنیادی عصبی تمایز نیافته هستند که ژن Nestin را بیان می کنند در حالی که سلولهای حاشیه نوروسفر سلولهای تمایز یافته بوده و ژن مذکور را بیان نمی کنند.

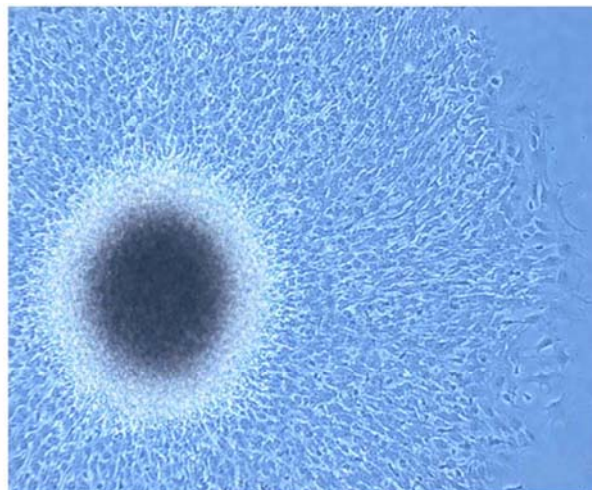
همچنین بررسیهای RT-PCR بیان ژنهای Nucleostemin، Bmi-1، ZFX، Hoxb-4 و Sox-9 را در سلولهای بنیادی عصبی نشان داد (شکل ۵). اندازه باندهای مربوط به ژنهای مورد مطالعه مطابق با پرایمرهای طراحی شده بود. نتایج به دست آمده در بخش ایمونوسیتوشیمی سه بار و در بخش PCR دو بار تکرار شد.



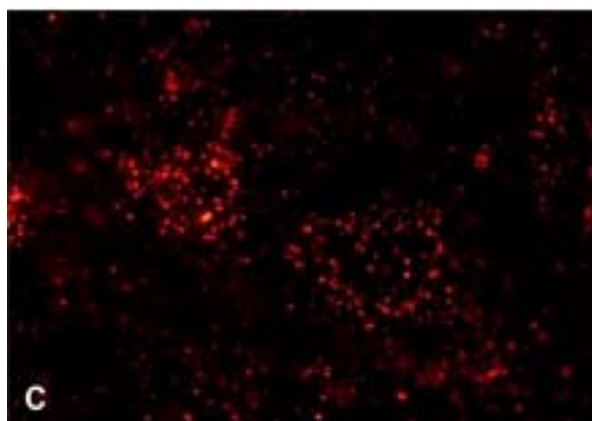
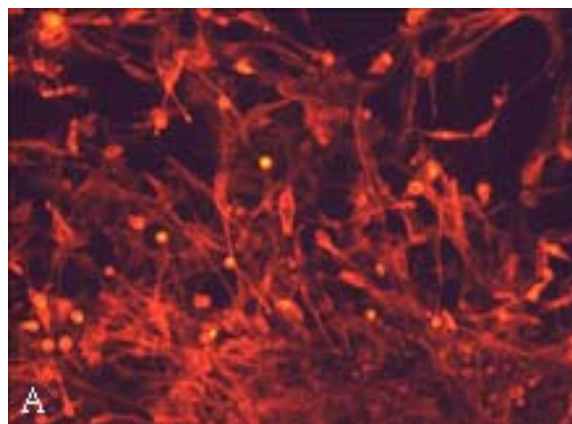
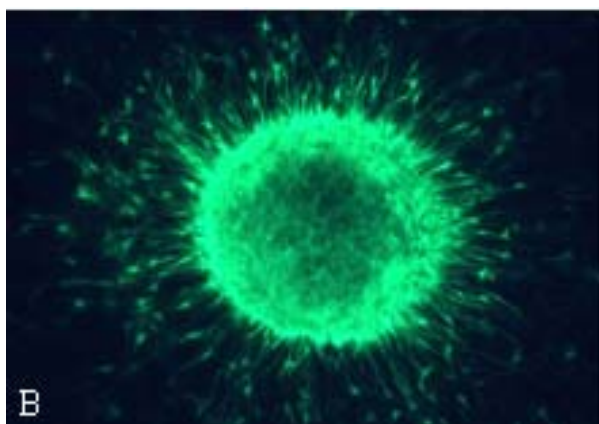
شکل ۱. تصاویر فازکنتراست مربوط به نوروسفرهای ثانویه تشکیل شده در روز پانزدهم پس از جداسازی. بزرگنمایی: $\times 100$



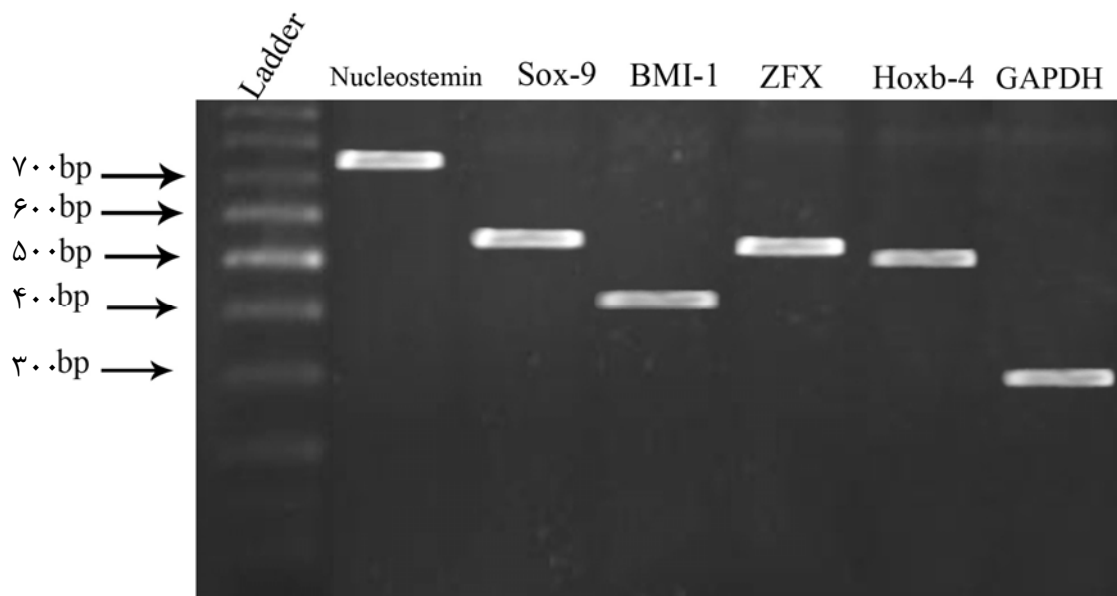
شکل ۲. (A) ایمونوسیتوشیمی سلولهای بنیادی عصبی که واکنششان به آنتی بادی بر علیه آنتی ژن Nestin مثبت شده است. (B) تصویر همان سلولها با میکروسکوپ فاز کنتراست. همان طور که مشاهده می شود، سلولهایی که در مرکز نوروسفرها قرار دارند، سلول بنیادی عصبی تمایز نیافته هستند که ژن Nestin را بیان می کنند در حالی که سلولهای حاشیه تمایز یافته و ژن مذکور را بیان نمی کنند. بزرگنمایی: $\times 200$



شکل ۳. تصویر میکروسکوپ فاز کنتراست سلولهای عصبی و گلیال تمایز یافته از نوروسفرهای اولیه پس از گذشت ۳ روز از انتقال نوروسفرها به ظرفهای پوشیده شده با پلی-ال-ارنیتین. بزرگنمایی: $\times 200$



شکل ۴. سلولهای حاصل از تمایز سلولهای بنیادی عصبی، ۱۰ روز پس از انتقال به به ظرفهای پوشیده شده با پلی-ال-ارنیتین. شکل های A, B, C بررسیهای ایمنوسیتوشیمی هستند که به ترتیب، نشان دهنده بیان مارکرهای GFAP, MapII و O4 توسط سلولهای تمایز یافته هستند. بزرگنمایی: $\times 200$



شکل ۵. بیان ژنهای Nucleostemin, Sox-9, BMI-1, ZFX و Hoxb-4 در سلولهای بنیادی عصبی به روش RT-PCR تایید شد.

بحث

سلولهای بنیادی عصبی به عنوان سلولهایی که قادر به تقسیم متقارن و نامتقارن بوده و توانایی تبدیل به سه نوع سلول اصلی موجود در CNS (نورونها، آستروسیتها و اولیگودندروسیتها) را دارند تعریف می شوند. این سلولها دارای قابلیت پاساژ سریال و کلونال بوده و یکی از موضوعات مهم تحقیقاتی و درمانی هستند. تعیین ویژگیهای سلولی و مولکولی این سلولها در هر دو حالت *in vitro* و *in vivo* حایز اهمیت زیادی است [۷، ۱۷ و ۱۸]. سلولهای بنیادی عصبی بعد از جداسازی در حضور فاکتور رشد اپیدرمال (EGF) و فاکتور رشد فیبروبلاستی (bfgf)، به صورت کره های شناوری تکثیر می شوند که اصطلاحاً به آنها واژه نوروسفر اطلاق می شود. نواحی مختلف و متعددی از CNS، از جمله پياز بویایی، ناحیه دور بطنی، کورتکس و نخاع، توانایی بالقوه تولید نوروسفر را دارند. اگرچه مشخص نیست دقیقاً کدام یک از سلولهای نواحی مذکور در اثر رشد به نوروسفر تبدیل می شوند [۲۲-۱۸]. سلولهای بنیادی عصبی

علاوه بر نوروسفر، به صورت کشتهای تک لایه ای (Monolayer) هم تکثیر می شوند. این کشتهای تک لایه به بسترهای مختلفی نیاز دارند. پلی-ال-اورنیتین / لامینین برای سلولهای ناشی از هیپوکامپ و پلی-ال-اورنیتین / فیبرونکتین در کشت سلولهای بنیادی قشری کاربرد دارند. به علاوه، سلولهای بنیادی عصبی می توانند از دیگر سلولها مانند سلولهای بنیادی جنینی نیز مشتق شوند [۲۷-۲۳].

باید تایید کرد که روشی وجود ندارد که در آن تکثیر سلولهای بنیادی عصبی خالص را داشته باشیم. در هر کدام از روشهای معمول، مقدار معینی تمایز خودبه خودی در سلولها روی داده و سلولهای بنیادی عصبی معمولاً همراه با سلولها تمایز یافته رشد می کنند. بنابراین شناسایی هر چه بیشتر مارکرهای اختصاصی سلولهای بنیادی عصبی، امری کاملاً ضروری به نظر می رسد [۲۲ و ۳۰-۲۸]. در حال حاضر مطالعات زیادی به منظور بررسی پتانسیل سلولهای بنیادی عصبی برای درمان اختلالات CNS در حال انجام است. بعد از پیوند این سلولها به نواحی مختلف، لازم است ردیابی این سلولها با استفاده از

مکانیسمهای کنترلی مشابهی برای تنظیم پتانسیل خودبازسازی در سلولهای بنیادی مختلف باشد. مشخص شدن جزئیات این مکانیسمها نیازمند بررسی کلیه ژنهای دخیل در خودبازسازی و مقایسه آنها در سلولهای مختلف است [۳۵ و ۳۶]. از طرفی مشخص شدن نقش دقیق هر کدام از این ژنها در تنظیم مکانیسمهای خودبازسازی سلولهای بنیادی، نیازمند تداخل در بیان این ژنها و بررسی آثار آن بر بیان سایر ژنها و سرنوشت سلول است. این تداخل می تواند به صورت افزایش یا کاهش بیان این ژنها اعمال شود.

تقدیر و تشکر

این پژوهش با مساعدت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کردستان انجام شده که بدینوسیله قدردانی به عمل می آید.

References

1. **Okano H.** Stem cell biology of the central nervous system. *J Neurosci Res* 2002; 69:698–707.
2. **Hall PA, Watt F M.** Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 1989; 106: 619–33.
3. **Potten CS, Loeffler M.** Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990; 110: 1001–20.
4. **Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ.** Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* 1999; 96:737–49.
5. **Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, et al.** Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 2000; 287:2032–6.
6. **Weissman IL.** Stem cells: units of development,

مارکرهای اختصاصی هر چه دقیقتر صورت گیرد. بنابراین مارکرهای مولکولی برای شناسایی سلولهای بنیادی عصبی در حالت *in vivo* یک نیاز اساسی است. سلولهای بنیادی عصبی ناهمگونی زیادی دارند. به طوری که ممکن است انواع مختلفی از سلولهای بنیادی عصبی وجود داشته باشد. برای مثال سلولهای جدا شده در حضور FGF2 یا EGF ممکن است خواص متفاوتی از نظر تمایز و سیکل سلولی با هم داشته باشند. به همین ترتیب نواحی مغزی و نخاعی مختلف به دسته های مختلفی از نورونها و سلولهای گلیال تبدیل می شوند [۲۲ و ۳۴–۳۱].

ژنهای ZFX و Hoxb-4 از جمله ژنهایی هستند که اخیراً (در سال ۲۰۰۷) نقش آنها در تنظیم خودبازسازی سلولهای بنیادی جنینی و خون ساز به اثبات رسیده است [۳۵ و ۳۶]. مطالعه حاضر برای اولین بار بیان این ژنها را در سلولهای بنیادی عصبی نشان داد که این می تواند پیشنهاد کننده وجود

units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000; 100: 157–68.

7. **Reynolds BA, Weiss S.** Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992 ; 255(5052):1707-10.
8. **Galli R, Gritti A, Bonfanti L, Vescovi AL.** Neural stem cells: an overview. *Circ Res.* 2003 Apr 4;92(6):598-608. Review.
9. **Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR.** Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 1998; 18: 7768-78.
10. **Cao QL, Howard RM, Dennison JB, Whittemore SR.** Differentiation of engrafted neuronal-restricted precursor cells is inhibited in the traumatically injured spinal cord. *Exp Neurol* 2002;177(2): 349-59.
11. **Galvin KA, Jones DG.** Adult human neural stem

- cells for cell-replacement therapies in the central nervous system. *Med J Aust* 2002; 177(6): 316-8.
12. **Peng L, Lian-hong J, Tao L, En-zhong L & Shi-guang Z.** Human neural stem cells promote corticospinal axons regeneration and synapse reformation in injured spinal cord of rats. *Chinese Med J* 2006; 119(16): 1331-8.
13. **Llado J, Haenggeli C, Maragakis NJ, Synder EY, Rothstein JD.** Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors. *Mol Cell Neurosci* 2004; 27: 322-31.
14. **Lindvall O, Rehncrona S, Brundin P, Gustavii B, Astedt B, Widner H, et al.** Human fetal dopamine neurons grafted into the striatum in two patients with severe Parkinson's disease. A detailed account of methodology and a 6-month follow-up. *Arch Neurol* 1989; 46(6): 615-31.
15. **Bottenstein JE.** Neural Stem Cells Development and Transplantation. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, USA, 2003, p 379.
16. **Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J.** Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999; 96(1): 25-34.
17. **Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, et al.** Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 1994; 13(5): 1071-82 .
18. **Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, et al.** Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 11879-83.
19. **Stemple DL, Anderson DJ.** Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* 1992; 71: 973-85.
20. **Reynolds BA, Weiss S.** Central nervous system growth and differentiation factors: clinical horizons--truth or dare? *Curr Opin Biotechnol.* 1993; 4: 734-8.
21. **Reynolds BA, Weiss S.** Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 1996; 175(1): 1-13.
22. **Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, et al.** Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci.* 1996;16(23): 7599-609.
23. **Palmer TD, Ray J, Gage FH.** FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci.* 1995;6(5):474-86.
24. **Bottenstein JE.** Neural Stem Cells Development and Transplantation. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, USA , 2003, p95-96 .
25. **Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI.** Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 1995; 168(2): 342-57.
26. **Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD.** Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev* 1996; 59(1): 89-102.
27. **Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A.** Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol.* 2003; 21(2): 183-6. Epub 2003 Jan 13.
28. **Lois C, Alvarez-Buylla A.** Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2074-7.
29. **Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA.** Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13883-8.
30. **Rietze RL, Valcanis H, Brooker GF, Thomas T,**

- Voss AK, Bartlett PF.** Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* 2001; 412:736-9.
31. **Milosevic A, Goldman JE.** Progenitors in the postnatal cerebellar white matter are antigenically heterogeneous. *J Comp Neurol* 2002; 452: 192-203.
 32. **Kornblum HI, Raymon HK, Morrison RS, Cavanaugh KP, Bradshaw RA, Leslie FM.** Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor: effects on an overlapping population of neocortical neurons in vitro. *Brain Res* 1990; 535: 255-63.
 33. **Vescovi AL, Reynolds BA, Fraser DD, Weiss S.** bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 1993; 11: 951-66.
 34. **Tropepe V, Sibilia M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF, van der Kooy D.** Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol* 1999; 208: 166-88.
 35. **Galan-Caridad J.M, Harel S, Arenzana T L, Hou E, Doetsch F K, Mirny L A, et al.** Zfx Controls the Self-Renewal of Embryonic and Hematopoietic Stem Cells. *Cell* 2007; 129: 345–357.
 36. **Cellot S, Sauvageau G.** Zfx: At the Crossroads of Survival and Self-Renewal. *Cell* 2007; 129: 239-41.